

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2003-250560

(43)Date of publication of application : 09.09.2003

(51)Int.Cl.

C12N 15/09
C07K 14/395
C12N 1/19

(21)Application number : 2002-055062

(71)Applicant : JAPAN SCIENCE &
TECHNOLOGY CORP

(22)Date of filing : 28.02.2002

(72)Inventor : IRIE KENJI
TAKIZAWA PETER A
VALE RONALD D
MATSUMOTO KUNIHIRO
HERSKOWITZ IRA

(54) PROTEIN RELATED TO INTRACELLULAR LOCALIZATION OF mRNA DERIVED FROM BUDDING YEAST, ITS GENE AND UTILIZATION OF THEM

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain a protein from a budding yeast and related to the location of a mRNA at cell division, a gene encoding the protein, and to provide a method for utilizing them.

SOLUTION: A protein Khd1 having functions of localizing ASH1mRNA at the tip part of a daughter cell, and a gene KHD1 encoding the protein Khd1 are identified by producing a gene-deleted strain in the budding yeast. The Khd1 bonds to the ASH1mRNA through the N-terminal coding region of the ASH1mRNA. When the Khd1 is expressed in large amount, the amount of the Ash1 is reduced. From these results, the Khd1 is considered to be related to the localization of the ASH1mRNA and the localized translation regulation, and is useful for the analyses of the mechanism of the intracellular localization of mRNAs.

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号
特開2003-250560
(P2003-250560A)

(43) 公開日 平成15年9月9日(2003.9.9)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	キーワード*(参考)
C 1 2 N 15/09	Z N A	C 0 7 K 14/395	4 B 0 2 4
C 0 7 K 14/395		C 1 2 N 1/19	4 B 0 6 5
C 1 2 N 1/19		15/00	Z N A A 4 H 0 4 5

審査請求 未請求 請求項の数 9 O L (全 16 頁)

(21) 出願番号 特願2002-55062(P2002-55062)

(22) 出願日 平成14年2月28日(2002.2.28)

(71) 出願人 396020800

科学技術振興事業団

埼玉県川口市本町4丁目1番8号

(72) 発明者 入江 賢児

大阪府吹田市津雲台5-14 津雲台合同宿
舎D3/号棟104号室

(74) 代理人 100080034

弁理士 原 謙三

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 出芽酵母由来のmRNAの細胞内局在に関与するタンパク質、その遺伝子およびそれらの利用

(57) 【要約】

【課題】 細胞分裂時のmRNAの局在に関与する出芽酵母由来のタンパク質とそれをコードする遺伝子、およびそれらの利用方法を提供する。

【解決手段】 出芽酵母において、遺伝子欠失株を作製することによって、ASH1 mRNAを娘細胞の先端部へ局在させるという機能を有するタンパク質Khd1およびそれをコードする遺伝子KHD1を同定した。さらに、Khd1は、ASH1 mRNAのN末端コード領域を介して、ASH1 mRNAと結合する。また、Khd1を多量発現するとAsh1の量が低下する。これらの結果から、Khd1は、ASH1 mRNAの局在とその局所的な翻訳制御に関与すると考えられ、mRNA細胞内局在の機構の解析に有用である。

【特許請求の範囲】

【請求項1】以下の(a)または(b)のタンパク質。

(a) 配列番号1に示されるアミノ酸配列からなり、mRNAの細胞内局在に因するタンパク質。

(b) 配列番号1に示されるアミノ酸配列において、1またはそれ以上のアミノ酸が置換、欠失、挿入、及び／又は付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、mRNAの細胞内局在に因するタンパク質。

【請求項2】前記タンパク質は、出芽酵母由来であり、細胞分裂時に転写因子Ash1をコードするASH1 mRNAを娘細胞の先端部へ局在させる因子の1つであることを特徴とする請求項1記載のタンパク質。

【請求項3】前記タンパク質は、前記ASH1 mRNAのN末端側をコードする領域と結合することを特徴とする請求項2記載のタンパク質。

【請求項4】請求項1～3のいずれか1項に記載のタンパク質をコードする遺伝子。

【請求項5】配列番号2に示される塩基配列を有する請求項4記載の遺伝子。

【請求項6】配列番号1に示されるアミノ酸配列において、1またはそれ以上のアミノ酸が置換、欠失、挿入、及び／又は付加されたアミノ酸配列からなり、細胞分裂時にmRNAを局在させる機能を失った変異タンパク質。

【請求項7】請求項6に記載の変異タンパク質をコードする変異遺伝子。

【請求項8】請求項1に記載のタンパク質の機能が破壊され、細胞分裂時にmRNAの局在が妨げられた形質転換体。

【請求項9】出芽酵母である請求項8記載の形質転換体。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、mRNAの細胞内局在に因するタンパク質、それをコードする遺伝子およびそれらの利用に関するものである。

【0002】

【従来の技術】多細胞生物の発生過程においては、細胞分裂時に細胞内のさまざまなタンパク質が不均等に分配され異なる2つの細胞を生じる非対称分裂が、細胞の多様性を生み出す基本的な機構となっている。このように、タンパク質を不均等に分配するための一つのメカニズムとして、上記タンパク質をコードしているmRNAを細胞内の異なった場所に局在させることが知られている。

【0003】単細胞真核生物である出芽酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)においても、このような非対称分裂が存在する。上記出芽酵母は、出芽によって細胞分裂を行う。上記出芽による細胞分裂で、出芽酵母は、母細胞(元の細胞)と娘細胞(出芽してできた細胞)とに

分離する。なお、このように細胞分裂した場合に、母細胞においては、接合型変換と呼ばれる一種の性転換が起きるが、娘細胞においては、上記接合型変換は起きないことが知られている。上記のような現象は非対称分裂の一例である。

【0004】上記接合型変換はHOエンドヌクレアーゼと呼ばれる酵素によって触媒される。上記HOエンドヌクレアーゼは、HO遺伝子によりコードされているが、上記HO遺伝子は、母細胞のみで発現し、娘細胞では発現しない。そのため、上記接合型変換は、母細胞のみで発生するのである(Nasmyth K.: Curr. Opin. Genet. Dev. 1993 3: 286-294参照)。すなわち、母細胞と娘細胞との非対称性は、上記HO遺伝子発現の違いであると言える。

【0005】また、上記HO遺伝子の母細胞特異的発現は、転写因子であるAsh1タンパク質によって決定されることが知られている。上記Ash1タンパク質は、細胞分裂時に娘細胞に局在し、HO遺伝子の転写を抑制することによって、娘細胞における接合型変換を妨げる。Ash1タンパク質の娘細胞特異的局在は、ASH1 mRNAが細胞分裂時に娘細胞の先端に局在し、翻訳されることによって発生する(Long et al.: Science.: 1997 277: 383-387, Takizawa et al.: Nature.: 1997 389: 90-93参照)。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】しかしながら、上記ASH1 mRNAの娘細胞への輸送中の翻訳抑制の仕組みや、娘細胞先端での局所的な翻訳機構については、未だ明らかにはなっていない。

【0007】上述のように、単細胞真核生物である発芽酵母だけでなく、多細胞生物の発生過程においても、細胞内の様々なタンパク質あるいはmRNAが不均等に分配されることが細胞の多様性を生み出す基本的な機構となっている。そのため、上記ASH1 mRNAの不均等な分配に関する新規分子は、細胞の非対称分裂の制御機構を解明し、さらに生物の発生分化過程を解明するツールとして極めて有用である。また、mRNAの細胞内局在異常に関わる種々の病気の病態解析やその治療薬の開発、治療改善に有効利用できる可能性もある。

【0008】本発明は、上記の問題に鑑みなされたものであり、その目的は、mRNAの細胞内局在に因するタンパク質、その遺伝子およびそれらを改変して得られる変異体ならびに形質転換体を提供することにある。

【0009】

【課題を解決するための手段】本願発明者等は、上記問題点を鑑み鋭意検討した結果、出芽酵母のゲノムにおいて、mRNA結合タンパク質をコードする複数の遺伝子に着目し、上記各遺伝子を欠失させた形質転換株を作製し、mRNAの局在への影響を調査した。その結果、ASH1 mRNAの娘細胞特異的局在に因するタンパク

質を見出し、本発明を完成させるに至った。

【0010】すなわち、本発明に係るタンパク質は、以下の(a)または(b)のタンパク質である。

(a) 配列番号1に示されるアミノ酸配列からなり、mRNAの細胞内局在に関与する(換言すれば、mRNAを細胞内局在させる因子の1つである)タンパク質。

(b) 配列番号1に示されるアミノ酸配列において、1またはそれ以上のアミノ酸が置換、欠失、挿入、及び/又は付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、mRNAの細胞内局在に関与するタンパク質。

【0011】上記「1またはそれ以上のアミノ酸が置換、欠失、挿入、及び/又は付加」とは、部位特異的突然変異誘発法等の公知の変異タンパク質作製法により置換、欠失、挿入、及び/又は付加できる程度の数のアミノ酸が置換、欠失、挿入、及び/又は付加されることを意味する。

【0012】上記(a)のタンパク質としては、出芽酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)由来のKhd1タンパク質を挙げることができる。出芽酵母は、細胞分裂によって母細胞と娘細胞とに分裂する際に、転写因子であるAsh1タンパク質をコードするASH1mRNAが娘細胞においてその先端部へ局在するという現象が見られる。本願発明者等は、上記Khd1タンパク質をコードする遺伝子KHD1を欠失させた、khd1欠失株(khd1Δ)を作製した。そして、上記khd1Δにおいては、野生株に比べて上記ASH1mRNAの娘細胞先端部への局在が著しく妨げられることを見出した。

【0013】上記Khd1タンパク質は、ASH1mRNAのN末端側をコードする領域と結合する。また、上記Khd1タンパク質は、配列番号1に示すアミノ酸配列中の42番目から112番目までの71アミノ酸、155番目から226番目までの72アミノ酸、および257番目から331番目までの75アミノ酸からなる3箇所の配列がそれぞれKHDドメインを形成することから、RNA結合タンパク質であると考えられる。上記KHDドメインを有するRNA結合タンパク質は、酵母だけでなくあらゆる高等な生物にまで進化上保存されたタンパク質である。従って、上記Khd1タンパク質と類似の構造を持ち、mRNAの細胞内局在に関与するタンパク質が、酵母だけでなく他の生物種にも存在する可能性が示唆される。

【0014】上記ASH1mRNAの娘細胞への局在に関与するタンパク質としては、She2、She3およびMyo4などが知られている。上記3つのタンパク質は、何れもASH1mRNAの運搬において機能すると考えられている。後述の実施例において、上記3つのタンパク質は、上記ASH1mRNAのN末端側をコードする領域以外の領域とも相互作用することが確認されている。このような結合領域の相違などから、上記Khd1タンパク質は、上記3つのタンパク質とは異なる役割

を果たすと考えられる。

【0015】また、本発明に係る遺伝子は、前述の(a)または(b)のタンパク質をコードする遺伝子であり、例えば、配列番号2に示される塩基配列を有する、後述の出芽酵母由来のKHD1遺伝子を挙げることができる。

【0016】ここで、遺伝子には、DNAおよびRNAが含まれるものとする。また、DNAには少なくともゲノムDNA、cDNAが含まれ、RNAには、mRNAなどが含まれる。また、DNAは2本鎖のみならず、それを構成するセンス側、アンチセンス側といった1本鎖でもよい。さらに、上記「遺伝子」は、上記(a)または(b)のタンパク質をコードする配列以外に、非翻訳領域(UTR)の配列やベクター配列(発現ベクター配列を含む)などの配列を含むものであってもよい。

【0017】また、本発明には、①配列番号1に示されるアミノ酸配列において、1またはそれ以上のアミノ酸が置換、欠失、挿入、及び/又は付加されたアミノ酸配列からなり、細胞分裂時にmRNAを局在させる機能を失った変異タンパク質、および、②この変異タンパク質をコードする変異遺伝子、が含まれる。

【0018】上記①の変異タンパク質について、上記「1またはそれ以上のアミノ酸が置換、欠失、挿入、及び/又は付加」とは、前述と同様に、部位特異的突然変異誘発法等の公知の変異タンパク質作製法により置換、欠失、挿入、及び/又は付加できる程度の数のアミノ酸が置換、欠失、挿入、及び/又は付加されることを意味する。ただし、上記①の変異タンパク質は、上記(b)のタンパク質とは異なり、細胞分裂時にmRNAを局在させる機能を失った変異タンパク質であり、ここで、「細胞分裂時にmRNAを局在させる機能を失った」とは、野生型本来の機能をほぼ完全に失った場合だけでなく、野生型に比べてその機能が明らかに劣る場合を含む意味である。

【0019】また、本発明に係る形質転換体は、前述の(a)または(b)のタンパク質の機能が破壊され、細胞分裂時にmRNAの局在が妨げられた形質転換体であり、例えば、後述のように形質転換され、作製された形質転換出芽酵母が挙げられる。ここで、「タンパク質の機能が破壊され」とは、結果として、細胞分裂時にmRNAの局在が妨げられるように、タンパク質をコードする遺伝子に変異が施されることをいい、当該遺伝子を欠失させることをも含む意味である。なお、このように遺伝子を変異あるいは欠失させる操作は、公知の遺伝子工学的手法(遺伝子操作技術)により行うことができる。

【0020】以上、本発明に係るタンパク質、遺伝子、変異体(変異タンパク質および変異遺伝子)、形質転換体は、細胞の非対称分裂の制御機構を解明し、さらに生物の発生分化過程を解明するツールとして極めて有用であり、前記Khd1タンパク質およびその遺伝子につい

ていえば、前記ASH1 mRNAの細胞内局在の仕組みを研究解析するための研究材料として有用である。また、本発明は、mRNAの細胞内局在異常に関わる種々の病気の病態解析やその治療薬の開発、治療改善に有効利用できる可能性がある。

【0021】

【発明の実施の形態】本発明の実施の一形態について、以下に説明する。なお、本発明は以下の記載に限定されるものではない。

【0022】本発明に係るタンパク質は、mRNAの細胞内局在に関するタンパク質である。なお、細胞内局在とは、mRNAを細胞内の特定の場所に局在させることである。上記細胞内局在は、タンパク質の不均衡な分配を導く一つの方法であり、多細胞生物の発生過程において、細胞の多様性を生み出す基本的な機構として非常に重要な要素となっている。

【0023】本実施の形態においては、本発明に係るタンパク質として、出芽酵母由来のKhd1タンパク質を挙げて説明する。

【0024】単細胞真核生物である出芽酵母においては、上記細胞内局在として、細胞分裂時に転写因子であるASH1 mRNAを娘細胞の先端部に局在させるという機構がある。上記ASH1 mRNAの局在が、その翻訳産物であるAsh1タンパク質の娘細胞特異的局在を保証している。上記Ash1は、出芽酵母における接合型変換を触媒するHO遺伝子発現の負の制御因子であり、Ash1が娘細胞特異的に局在する結果、HO遺伝子は母細胞のみで発現する。

【0025】上記Khd1タンパク質は、配列番号1に示すアミノ酸配列中の42番目から112番目に示す71アミノ酸、155番目から226番目に示す72アミノ酸、および257番目から331番目に示す75アミノ酸からなる3箇所の配列が、それぞれRNA結合部位であるKHDメインを形成している。そして、上記Khd1タンパク質は、後述の実施例に示すように、上記ASH1 mRNAのN末端側をコードする領域と結合することによって、上記ASH1 mRNAの娘細胞の先端部への局在に関与している。なお、上記娘細胞の先端部とは、母細胞から出芽する娘細胞において、その出芽部分（母細胞との境界部分）から最も離れた位置のことを意味する。また、上記ASH1 mRNAのN末端側をコードする領域とは、図6のASH1 mRNAの模式図に示される領域であるが、具体的には、上記ASH1 mRNAの塩基配列において、翻訳領域中の開始コドンATGのAを1番目の塩基とした場合に、上記ヌクレオチド配列の1番目から804番目までの804塩基からなる領域のことを意味する。

【0026】さらに、後述の実施例に示すように、Khd1タンパク質を過剰発現するとAsh1タンパク質のレベルが減少することから、上記Khd1タンパク質

は、ASH1 mRNAの翻訳制御に影響を及ぼしている。

【0027】本発明に係る遺伝子としては、出芽酵母由来のKHD1遺伝子が挙げられる。上記KHD1遺伝子は、配列番号2に示す塩基配列をオープンリーディングフレームとして有し、配列番号1に示すアミノ酸配列をコードする遺伝子である。

【0028】なお、配列番号2に示す塩基配列は、YBL032w遺伝子として、データベース（アクセッション番号Z35793）に登録されているORF（オープンリーディングフレーム）部分の配列である。

【0029】上記YBL032w遺伝子は、従来、塩基配列は知られていたものの、その機能については特徴づけられておらず、本明細書において後述するとおり、本願発明者等によって、ASH1 mRNAの細胞内局在に関与するという機能が明らかとなった。そのため、YBL032w遺伝子は、KHD1遺伝子と命名された。

【0030】なお、本発明にかかるKHD1遺伝子としてのDNAは、生物のゲノム中に含まれる形態、すなわちイントロンなどの非コード配列を含む「ゲノム」形DNAであってもよいし、逆転写酵素やポリメラーゼを用いてmRNAを経て得られるcDNA、すなわちイントロンなどの非コード配列を含まない「転写」形DNAであってもよい。

【0031】また、本発明にかかるKHD1遺伝子としてのDNAは、コードされているKhd1タンパク質の形成に悪影響を与えないか妨げない限りにおいて、他のDNA配列を含んでいてもよい。

【0032】ところで、上記ASH1 mRNA局在には、既に5つの遺伝子SHE1-SHE5が関与することが知られている。SHE1はタイプVのミオシンモーターMyo4をコードしている。Myo4は、娘細胞の先端で、ASH1 mRNAと共に局在している。即ち、Myo4とASH1 mRNAとは結合して一体となり、母細胞から娘細胞へすばやく移動する。これは、Myo4がASH1 mRNAの娘細胞先端部への移動に直接的な役割を果たすことを示唆している。

【0033】SHE2は、ASH1 mRNAと直接結合するRNA結合タンパクShe2をコードする。SHE3の翻訳産物であるShe3のC末端は、She2と相互作用し、そのアミノ末端はMyo4と相互作用する。よって、She3はMyo4をShe2-ASH1 mRNA複合体と連結させるアダプターの特性を有している。SHE5は、アクチン細胞骨格の制御に関わるタンパクをコードする遺伝子である。従って、アクチンモシンを基礎とした運搬により、ASH1 mRNAが娘細胞の先端に局在することが示唆される。

【0034】上記の研究によって、ASH1 mRNA局在のために、ASH1 mRNA-She2-She3-Myo4複合体が形成され、極性が与えられたアクチン

フィラメントに沿って、娘細胞の先端部に運搬されることが明らかとなっている。

【0035】しかしながら、実施例において示すように、上記Khd1タンパク質は、上記She2、She3およびMyo4とは異なり、上記ASH1 mRNAのN末端側をコードする領域とのみ相互作用する。従って、本発明において、新たに見出された上記Khd1タンパク質およびKHD1遺伝子は、上述のASH1 mRNAの細胞内局在機構に、重要な役割を果たすとともに、上記ASH1-ASH5遺伝子とは異なる役割を果たしていることが示唆される。

【0036】本発明にかかるKHD1遺伝子のクローニング方法としては、従来公知の方法を利用することが可能であり、特に限定されるものではない。本発明においては、出芽酵母の全塩基配列は既に決定されているため、データベースからKHD1遺伝子を同定し、酵母ゲノムDNAをテンプレートとして、PCRを行うことが好ましい。

【0037】また、KH-RNA結合モチーフを有する遺伝子は、進化上高等生物にまで保存されている遺伝子であることから、本発明では、出芽酵母由来の上記KHD1遺伝子を用いて、他の生物からKHD1遺伝子と同一性を有するDNAをクローニングすることが可能である。この場合のクローニング方法としても、従来公知の方法を利用することが可能であり、特に限定されるものではない。

【0038】具体的には、ゲノムの少なくとも一部がデータベース化されている生物の場合には、上記KHD1遺伝子の塩基配列に基づいて同一性のある塩基配列をデータベース中から検索すればよい。例えば、汎用されている同一性検索アルゴリズムであるBLASTによる塩基配列及びアミノ酸配列レベルの同一性検索を好適に用いることができる。

【0039】また、ゲノムがデータベース化されていない生物の場合には、例えば、従来公知のDNAライブラリーを用いたハイブリダイゼーション法を用いることもできる。具体的には、適切なクローニング・ベクターを使用して対象となる生物からゲノムライブラリー又はcDNAライブラリーを調製するステップと、上記KHD1遺伝子の少なくとも一部をプローブとして用いてハイブリダイゼーションを行い、ライブラリーから上記プローブにポジティブの断片を検出するステップとを含む方法を用いることができる。

【0040】このように本発明のKHD1遺伝子のうち、少なくとも一部の領域はプローブとして有用である。プローブに用いる領域には、KHD1遺伝子に特異的な配列が含まれることが好ましい。また、プローブとして使用されるポリヌクレオチドの長さは、特に限定されるものではなく、適当な長さのものをを用いればよい。

【0041】上記の構成によれば、他の生物において

も、mRNAの細胞内局在に関与する可能性を有した遺伝子を取得することができる。そして、上記遺伝子は、上記ASH1 mRNAの細胞内局在の仕組みを研究解析するための研究材料として有用である。

【0042】さらに本発明には、配列番号1に示されるアミノ酸配列において、1またはそれ以上のアミノ酸が置換、欠失、挿入、及び／又は付加されたアミノ酸配列からなり、細胞分裂時にmRNAを局在させる機能を失った変異タンパク質も含まれる。そして、さらに上記変異タンパク質をコードする変異遺伝子も本発明の範囲内に含まれる。つまり、本発明には、配列番号1に示すアミノ酸配列を有するKhd1タンパク質の変異体であって、ASH1 mRNAを娘細胞の先端部へ局在させる機能を失った変異タンパク質も含まれる。

【0043】上記変異遺伝子は、部位特異的突然変異誘発法(site-directed mutagenesis)などの、従来公知の遺伝子工学的手法によって、上記KHD1遺伝子の一部を改変することによって得ることができる。さらに、上記変異遺伝子を発現可能な状態で宿主細胞に導入すれば、上記変異タンパク質を取得することができる。なお、上記変異タンパク質のアミノ酸配列において、1またはそれ以上のアミノ酸を置換、欠失、挿入、及び／又は付加するという変異を発生させる部位は、野生型タンパク質の機能を保持する上で必須の領域を含むことが好ましい。

【0044】上記のような部位において変異を発生させれば、mRNAの局在を妨げる可能性の高い変異タンパク質を得ることができる。そして、上記変異タンパク質は、細胞の非対称分裂の制御機構の解明に好適に用いられることができる。

【0045】また、本発明には、上記変異タンパク質をコードする遺伝子を出芽酵母の細胞内に発現可能に導入した形質転換出芽酵母も含まれる。上記形質転換酵母を作製する方法としては、特に限定されることなく、従来公知の遺伝子工学的手法を用いることができる。

【0046】さらに本発明において、上記形質転換出芽酵母は、本発明に係るタンパク質をコードする遺伝子を欠失させたものでもよい。上記形質転換酵母として、具体的には、例えば、実施例に示す上記Khd1タンパク質をコードする遺伝子を欠失させたkhd1遺伝子欠失株(khd1Δ株)が挙げられる。

【0047】なお、本実施例においては、上記khd1遺伝子欠失株として、配列番号2に示すKHD1遺伝子のオープンリーディングフレームを欠失させているが、上記形質転換出芽酵母はこれに限定されるものではない。すなわち、野生型の出芽酵母におけるKhd1タンパク質の機能を失う、あるいは野生型と比較して上記機能が劣るように、上記KHD1遺伝子の一部を改変させて導入するようにしてもよい。

【0048】上記形質転換出芽酵母は、ASH1 mRNA

Aの細胞内局在の仕組みおよび、ASH1 mRNAの翻訳制御機構の解明に用いられることができる。

【0049】

【実施例】次に、本発明を実施例により詳細に説明する。なお、本発明は、以下の記載に限定されるものではない。また、以下の実施例において使用された酵母菌株は図3の表に示し、使用されたプラスミドは図4の表に示す。

1. 遺伝子欠失株の作製

酵母ゲノムは、RNA結合タンパクのPufファミリーの相同をコードする5つの遺伝子、PUF1/JSN1、PUF2、PUF3、PUF4/YGL014w、PUF5/MPT5、および、KHRNA結合モチーフを含むタンパク質をコードする5つの遺伝子MER1、MSL5、PBP2、SCP160、YBL032wを含む。上記10個の遺伝子のうち、必須遺伝子であるMSL5を除く9個の遺伝子に着目した。そして、PCRを基本とした遺伝子欠失法によって、上記9個の各遺伝子をそれぞれ欠失した形質転換株を作製した(Baudin, A.etal:Nucleic Acids Res.: 21: 3329-3330 (1993)、Schneider, D et al: Gene: 177: 243-251 (1996)、Sakumoto, N. et al: Yeast: 15: 1669-1679 (1999))。

【0050】プライマーセットは、目標遺伝子の相当する領域の5'末端と相補的な配列を有する46塩基、および選択マーカーとしてC.glabrata HIS3遺伝子を含むプラスミドpCgHIS3pにおいてポリリンカー領域の外側のpUC19配列と相補的な3'末端と相補的な配列を有する20塩基が設計された。PCR用プライマーセットがオープンリーディングフレームを欠失するように設計された。上記PCR産物は、His選択性によって10B株を形質転換するために使用された。予想される遺伝子座に発生した置換を確認するために、コロニーPCR増幅によって遺伝子の破壊が立証された(Huxley C. et al: Cell: 84: 687-697 (1996))。

2. ASH1 mRNAの局在に関するタンパク質の同定

上記の方法により得られた各遺伝子欠失株のうち、mpt5Δ(mpt5遺伝子欠失株)およびscp160Δについては、37℃で温度感受性を示したが、9個の遺伝子欠失株は全て生存可能であった。上記9種の遺伝子欠失株について、ASH1 mRNAの局在をin situ ハイブリダイゼーション(Takizawa et al: Nature: 389: 90-93 (1997))で観察した。結果を図1の表に示す。なお、図1において、Δは各遺伝子欠失株を示す。また、図1の表に示す数値は左より順に、局在したもの、娘細胞内で非局在のもの、母細胞内および娘細胞内で非局在のもの、母細胞と娘細胞との間のくびれ部に局在したものの割合を示す。

【0051】図1に示すように、mpt5Δ、scp160Δおよびybl032wΔにおいては、野生型(wi

ld-type)と比較して、娘細胞あるいは、娘細胞および母細胞に非局在化が発生している割合が明らかに高く、部分的に非局在化が発生していると考えられる。上記3種の形質転換株以外の形質転換株においては、ASH1 mRNAは、野生株と有意な差は見られず、娘細胞の先端部に局在していることが確認された。なお、YBL032wは今まで特徴づけられていなかったため、本願発明者等がKHD1(KH-domain protein 1)と命名した。したがって、上記3つの遺伝子MPT5、SCPおよびKHD1の翻訳産物であるMpt5、Scp160およびKhd1が、ASH1 mRNAの局在に関与するタンパク質であると予想された。

【0052】続いて、上記3つのタンパク質Mpt5、Scp160およびKhd1がASH1 mRNA局在に直接的に関与しているかを評価するために、緑色の蛍光を示すタンパク質GFPを用いて、以下のような実験を行った。

【0053】この実験では、2つのプラスミドU1Ap-GFPおよびU1A tag-ASH1を用いて形質転換が行われた。上記U1Ap-GFPは、U1AのRNA結合ドメインの融合タンパクとGFPの変異体とを発現し、上記U1A tag-ASH1は、GAL1プロモーターにコントロールされるスタートコドンの下流にU1A結合シークエンスを含むASH1 mRNAを発現する。従って、U1Ap-GFPとU1A tag-ASH1とを用いて形質転換された細胞は、GFPとASH1 mRNAと共に局在する。GFPは蛍光標識されるため、その位置を確認することができる。

【0054】mycタンパク質を標識としてKhd1、Scp160、Mpt5の各タンパク質に付加したmyc標識株、khd1myc株、scp160myc株、mptmyc株がそれぞれ作製された。上記各myc標識株は、上記のプラスミドU1Ap-GFPおよびU1A tag-ASH1で形質転換された。そして、上記各myc標識株にて得られるmyc標識タンパクは、抗myc抗体を使用してブロッティングされた。

【0055】上記の結果を図5に示す。図5に示すように、khd1myc株においてのみ、myc標識タンパクが娘細胞の末端に局在することが確認された。また、ASH1 mRNAと同一位置にあるGFPについては、各株共に娘細胞に局在していることが確認された。この結果は、Khd1mycとASH1 mRNAとが共に局在することを意味する。従って、Khd1がASH1 mRNAの局在に、直接的な役割を果たしていることが示唆される。

3. Khd1のASH1 mRNAに対する結合領域の確認

ASH1 mRNAは、図6に示すように、3つのcis-acting局在部位:N・C・Uを有している。上記3つの部位は、娘細胞に非相同のレポーターmRNA

の局在に十分である。U部位は3'UTR(3'末端非翻訳領域)に位置するのに対し、2つの部位(N・C)はASH1読み取り枠(オープンリーディングフレーム即ちORF)内に位置する。ASH1 mRNAのどの部位がKhd1とASH1 mRNAとの同一局在の原因となるかを決定するために、本願発明者等は各部位がU1A標識された形質転換株U1A-tag株を作製した。すなわち、これらの部位すべてを含むU1A-tag-Ful1株に加え、N部位のみを含むU1A-tag-N株、C部位のみを含むU1A-tag-C株およびU部位のみを含むU1A-tag-U株を作成した(図2参照)。なお、使用したプラスミドは図4に示す。

【0056】なお、本実験は、ASH1 mRNAの運搬に関与するタンパク質Myo4、She2およびShe3においても同様に実施された。また、本実験には、上述のmyc標識株、khd1myc株、myo4myc株、she2myc株およびshe3myc株を使用した。

【0057】その結果を、図7に示す。なお、図7(a)は、khd1myc株における結果を示す写真であり、図7(b)は、she3myc株における結果を示す写真である。

【0058】上記の各U1A-tag株は、ASH1 mRNAがU1A-p-GFPと共に発現したとき、蛍光標識される。図7(a)上段および(b)上段の写真に示すように、上記全てのU1A-tag株において、ASH1 mRNAおよびGFPが娘細胞に局在していることがわかる。即ち、3つの各RNA部位単独でも、ASH1 mRNAおよびGFPの娘細胞への局在に十分であることを示している。そして、Khd1myc、Myo4myc、She2mycおよびShe3mycについて、娘細胞への局在の有無を確認した。

【0059】その結果を図6に示す。Myo4myc、She2mycおよびShe3mycにおいては、U1A-tag-ASH1 mRNAの3つすべての部位からのGFPシグナルと同一局在をすることを見出した。一方、Khd1mycはU1A-tag-Nとは共に局在したが、U1A-tag-CおよびU1A-tag-Uとは共に局在しなかった。なお、図7(a)および(b)の中段には、Khd1mycあるいはShe3mycにおける娘細胞への局在の確認をおこなった結果を示す。これらの結果は、Khd1が、ASH1 mRNA運搬において機能するMyo4、She2およびShe3とは異なった役割を持っているかもしれないことを示唆している。

4. 生体内(in vivo)におけるKhd1とASH1 mRNAとの結合

ASH1 mRNAとKhd1との同一局在は、Khd1が生体内でASH1 mRNAと結合していることを示唆している。この可能性をテストするため、本願発明者等は、ASH1 mRNAが免疫沈澱とRT-PCR法とを

用いて、Khd1mycと共免疫沈澱するかを追跡した。Munchowらが従来文献(J. Cell Sci.:112:1511-1518)において、ASH1 mRNAをShe3mycとともに共免疫沈澱を示したように、myc標識されたShe3をポジティブコントロールとして用いた。

【0060】khd1myc株とshe3myc株とは、コントロールプラスミドとYE pASH1とにより形質転換された。細胞溶解物は上記2つの株から調製され、抗mycモノクローナル抗体の免疫沈澱に使用された。

【0061】抗原決定基にtagされたKhd1とShe3とは、抗myc抗体9E10(myc)またはコントロールIgG(c)を用いて免疫沈澱された。各免疫ベレットは10%SDS-PAGEゲルで分離後ブロットされ、エピトープ標識されたタンパク質(Khd1myc、She3mycまたはU1A-p-GFP)の存在を抗myc抗体かアンチGFP抗体でプローブした。RNAは細胞抽出液(トータル)と免疫沈澱(IP)とより抽出され、RT-PCRにテンプレートとして使用された。図8(a)には、360-bpのPCR産物が、ASH1特異的なプライマーを用いて増幅された場合の結果を示す。図8(b)には、420-bpと380-bpとのPCR産物が、それぞれU1A-tag-N(N)、U1A-tag-U(U)に特異的なプライマーを用いて増幅された場合の結果を示す。各反応の5分の1は2%アガロースゲルで分離され、エチジウムブロマイドにより染色された。

【0062】図8(a)において、レーン1は、untagged株[YE pASH1];レーン2は、khd1myc株[YE p1ac181];レーン3は、khd1myc株[YE pASH1];レーン4は、she3myc株[YE p1ac181];レーン5は、she3myc株[YE pASH1]である。図8(b)において、レーン1・2は、khd1myc株[U1A-tag-N+U1A-p-GFP];レーン3・4は、khd1myc株[U1A-tag-U+U1A-p-GFP];レーン5・6は、she3myc株[U1A-tag-U+U1A-p-GFP]である。U1A-p-GFPの総量はどの細胞抽出液でも同じであった。使用された菌株は、untagged株は10B、khd1myc株はYKEN203、she3myc株は#134である(図2参照)。

【0063】抗myc抗体は、酵母抽出液からのKhd1mycタンパク質とShe3mycタンパク質とを効果的に沈殿させた(図8(a))。免疫沈澱のRT-PCR分析によって、khd1myc株およびshe3myc株からの免疫沈澱における内在的なASH1 mRNAを検出した。対照的に、untaggedの株からの免疫沈澱でのASH1 mRNAは、検出されなかった(図8(a))。PCR産物は逆転写を行わないと見られず、このバンドの編成はRNAに依存していることを示して

いる。これらのデータはKhd1がASH1 mRNAと生体内で結合していることを示している。

【0064】Khd1mycのASH1 mRNAとの結合が、N部位によって仲介されるかを調べるため、U1Atag-NあるいはU1Atag-Uと、U1Atag-GFPとが共発現するkhd1myc株から、Khd1mycタンパクを免疫沈澱した。アンチmyc抗体との免疫沈澱のRT-PCR分析により、免疫沈澱にU1Atag-N mRNAが検出された(図8(b)のレーン2)。U1Ap-GFPはKhd1mycとも共に免疫沈澱した。これは、KhdmycがU1Atag-N mRNAを通してU1Ap-GFPと複合体をつくることを示唆している。対照的に、U1Atag-UとU1Ap-GFPとが共発現するKhd1myc株において、U1Atag-U mRNAおよびU1Ap-GFPがKhd1mycと共に免疫沈澱しなかった(図8(b)レーン4)。コントロールとして、She3mycがU1Atag-UおよびU1Ap-GFPと共に発現した時に、She3myc免疫沈澱において、U1Atag-U mRNAとU1Ap-GFPとを検出した(図8(b)レーン6)。これらの結果はKhd1mycのASH1 mRNAとの結合がN部位によって仲介されている可能性を支持する。

5. KHD1およびSHE遺伝子間における遺伝的相互作用の調査

HO遺伝子の不均等発現はASH1 mRNAの局在により結果的に決定されている。she突然変異におけるASH1 mRNAの非局在化はHO発現の減少を引き起こす。khd1欠失株(khd1Δ株)は、図1に示すように、ある程度ASH1 mRNAの局在に影響する。そのため、HO遺伝子発現を観察するためにHOp-ADE2レポーター遺伝子を用いて、khd1ΔのHO発現への影響を調べた。なお、各タンパク質Myo4、She2、She3をコードする遺伝子は、それぞれSHE1、SHE2、SHE3である。

【0065】ho遺伝子座でHOp-ADE2はhoORFをADE2 ORFに取り替えることで作成された。よって、レポーターの発現は、アデニン欠乏培地(SC-Ade)での増殖によるade2Δにおいて検定される。

【0066】HOp-ADE2レポーターを含むmyo4Δ株とshe3Δ株とは、SC-Adeプレートで増殖しなかった(図9(b)参照)。これは、myo4Δ株あるいはshe3Δ株におけるSHE1またはSHE3の不活性化が、ASH1 mRNAの非局在化を導き、HOp-ADE2レポーターを抑制させていることを示す。

【0067】一方、khd1Δ株はHO発現にほとんど影響を与えなかった(図9(a)参照)。khd1Δ株における接合型転換の頻度は、野生型株と同じであった。そして、khd1Δ突然変異が、弱いmyo4-9

10変異に関連し、それだけではHO発現にほとんど影響しない表現型に、影響するかを調べた。khd1Δmyo4-910ダブルミュータントは、SC-Adeプレートにおける増殖を著しく減少させた。これは、これらの細胞におけるHO発現のレベルの減少を示す(図9(a)参照)。このSC-Adeプレートにおけるkhd1Δmyo4-910ダブルミュータントの増殖の減少はASH1遺伝子に依存する。これは、ASH1遺伝子の破壊が、その増殖欠損を抑制することからわかる。よって、khd1Δ株におけるKHD1遺伝子欠失はmyo4変異のHO発現への影響を増強する。これは、KHD1遺伝子は遺伝的にMYO4と相互作用することを示す。

【0068】KHD1とSHE遺伝子との間の遺伝的相互作用をより詳しく分析するために、myo4Δおよびshe3Δ変異体におけるHO発現に対するKHD1過剰発現の影響を調べた。GAL1プロモーターによるKHD1の過剰発現は、myo4Δおよびshe3Δ変異体において、HO発現の減少を防いだ(図9(b))。これらの結果は、KHD1とSHE遺伝子との間の遺伝的相互作用の可能性を示し、Sheタンパク質のステップとは違うステップにおいて、Khd1がASH1 mRNA局在に影響することを意味している。

6. KHD1の過剰発現のSHE遺伝子への影響の調査
続いて、KHD1過剰発現が、HO発現へのshe変異体の影響をどのように抑制するかを調査した。ASH1はネガティブにHOp-ADE2レポーターの調整をし、ASH1遺伝子の破壊がshe変異体におけるHO発現欠陥を抑制することができる(図9(b))。この観察は、she変異体でAsh1タンパク質レベルを減らすことで観察されるHO発現の減少を、KHD1が抑制させる可能性を示している。この可能性をテストするため、GAL1プロモーターによりKHD1発現を誘導したあと、myc-tggedAsh1タンパク質の量を測った。ウェスタンブロッティング分析は、KHD1過剰発現がAsh1myc3.6-foldのレベルを減じることが明らかにした(図10(a))。関係のないTub1タンパク質は変化しないので、この減少はKHD1過剰発現に誘導された毒性によりもたらされるものではない(図10(a))。KHD1の過剰発現はASH1 mRNAのレベルに影響しなかった(図10(b))。これらの結果はKHD1がASH1 mRNAの翻訳制御に関連するかもしれないことを示している。

【0069】次に、ASH1 mRNA局在へのKHD1過剰発現の影響を調べた。ASH1 mRNAはKHD1を過剰発現した株で非局在化されると考えられる(図10(c)、(d))。野生型株では、ASH1 mRNAの76%が娘細胞の先端の皮層に局在する。KHD1が過剰発現すると、ASH1 mRNAが娘細胞の内部(47%)あるいは、母細胞と娘細胞(17%)とに拡散し

て局在する。これらの結果は、KHD1過剰発現によるASH1 mRNAの翻訳の阻害が固定されたASH1 mRNAの現象を引き起こすのかもしれない、と示唆している。

7. ASH1 mRNAの翻訳と局在との関係の調査

KHD1が、ASH1翻訳の調節によってASH1 mRNAの局在を調節することができるという可能性は、言い換えると、ASH1 mRNA翻訳がASH1 mRNA局在に影響を与えることができる可能性を示唆している。ASH1 mRNAは娘細胞の先端部で翻訳され、ASH1タンパクと共に、中央部である娘細胞の核へ運搬されると考えられている。

【0070】ASH1 mRNAの翻訳がそれ自身の局在に影響するかどうかという問題を扱うために、野生型ASH1 mRNAの局在を、イニシエーターATGコドンに欠いたASH1 mRNA (ASH1 atg⁻mRNA)の局在と比較した。上記2つのmRNAは、共にGAL1プロモーターのコントロール下に置かれ、GAL1p-ASH1とGAL1p-ASH1 atg⁻構成物を生成させた。ウェスタンブロッティング分析によって、GAL1p-ASH1 atg⁻由来のmRNAがASH1タンパク質を生成できないことが示された。ノーザンブロッティングは、ASH1 atg⁻mRNAが、野生型ASH1 mRNAと同じレベルで存在することを示した(図11(a))。しかし、野生型ASH1 mRNAと比べると、ASH1 atg⁻mRNAは娘細胞内で非局在化されると考えられる(図11(b)と(c))。野生型ASH1 mRNAの60%が先端皮層に局在するのに対し、74%のASH1 atg⁻mRNAは娘細胞の内部に拡散して局在している。これらの結果は、ASH1 mRNAの翻訳は、ASH1 mRNAを娘細胞の先端皮層に固定する役割を持っていることを示している。

8. 考察

ASH1 mRNAの翻訳、固定、運搬に関与するRNA結合タンパク質を同定するために、異なったRNA結合タンパク質の候補と、そのASH1 mRNAの局在下の影響とを体系的に調査した(図1参照)。その結果、ASH1 mRNAはmpt5Δ株、scp160Δ株とkhd1Δ株とで部分的に非局在化が起こった。Khd1はU1 Atag-ASH1 mRNAからのGFPシグナルと共に局在する。Scp160とMpt5とは共に局在しない(図5参照)。加えて、共免疫沈殿実験はKhd1がN部位を通してASH1 mRNAと結合することを示唆している(図8参照)。これらの結果は、Khd1がASH1 mRNA局在のある面で直接的な役割を担っていることを示している。

【0071】ASH1 mRNAは3つの局在部位を含み、それぞれの部位がレポーターmRNAの娘細胞への局在に関与している(図6参照)。しかし、各部位はA

SH1 mRNAの娘細胞の先端部への強固に固定するものではない。各部位を独立にテストすると(図5、6参照)、Myo4、She2およびShe3が、ASH1 mRNA粒子の3つすべての部位からのGFPシグナルと共に局在することを見出した。

【0072】一方、Khd1はN部位(U1 Atag-N)と共に局在したが、CやU部位(U1 Atag-C、U1 Atag-U)とは共に局在しなかった。khd1Δ株では、Myo4が娘細胞のU1 Atag-Nと共に局在した。これは、KHD1が娘細胞でのN部位の局在および、N部位とMyo4との共局在に必要でないことを示している。さらに、khd1Δmyo4-910ダブルミュータントでのASH1 mRNAの局在の様子は、myo4-910シングルミュータントの局在の様子と似ていた。これは、khd1Δ株がmyo4-910株の、ASH1 mRNA局在における部分的欠陥を悪化させないことを示唆している。まとめると、これらの結果はKhd1が、ASH1 mRNA運搬に機能すると考えられるMyo4、She2、She3とは異なった役割を持っているかもしれないことを示唆している。

【0073】また、ASH1 mRNAは、ASH1 mRNA-She2-She3-Myo4からなる複合体の一部として、2極化したアクチンフィラメントを使って、娘細胞の先端部へと運搬される。ASH1 mRNAは娘細胞の先端部で翻訳され、そして中央部、娘核へと搬送されると考えられる。どのようにASH1 mRNAが娘細胞の先端部に固定され、どのようにASH1 mRNAの翻訳が調整されるかは未だ明らかでない。

【0074】本実施例では、ASH1 mRNAを娘細胞の先端部にしっかりと固定するには、ASH1 mRNAの翻訳が必要であることが見出された。野生型のASH1 mRNAと比べると、イニシエーターATGコドンを欠くASH1 atg⁻mRNAは娘細胞内でいくらか非局在化が起こった(図11(b)、(c))。KHD1の過剰発現は、ASH1 mRNAの翻訳を阻害し、適切なASH1 mRNAの局在を損なう(図10(c)、(d))。

【0075】また、KHD1の過剰発現はAsh1タンパク質の発現の減少を生ずる。これはKHD1がASH1 mRNAのN部位との結合を通して、ASH1 mRNA翻訳制御に関与している可能性を示唆している。酵母において上記Khd1が、mRNA局在とその翻訳とに関与するという発見は、mRNA局在とその起こりうる翻訳との関係において、KHDメインタンパク質の機能を明らかにする方法を提供する可能性を有している。

【0076】

【発明の効果】以上のように、本発明にかかるタンパク質は、mRNAの細胞内局在に関与するタンパク質およびそれをコードする遺伝子である。また本発明には、上記遺伝子あるいはタンパク質を改変して得られる変異体

および形質転換体も含まれる。

【0077】上記の構成によれば、本発明に係る遺伝子およびタンパク質は、細胞の非対称分裂の制御機構を解明し、さらに生物の発生分化過程を解明するツールとして極めて有用である。また、上記遺伝子およびタンパク

質は、mRNAの細胞内局在異常に関わる種々の病気の病態解析やその治療薬の開発、治療改善に有効利用できる可能性もある。

【0078】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Japan Science and Technology Corporation

<120> Newly found proteins related to the proper localization of mRNA,
and genes which code the proteins
and use of the proteins and the genes

<130> A191P21

<160> 2

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 381

<212> PRT

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 1

```
Met Ser Gln Phe Phe Glu Ala Ala Thr Pro Val Ala Ile Pro Thr Asn
  1             5             10             15
Asn Thr Asn Gly Gly Ser Ser Asp Ala Gly Ser Ala Ala Thr Gly Gly
      20             25             30
Ala Pro Val Val Gly Thr Thr Ala Gln Pro Thr Ile Asn His Arg Leu
      35             40             45
Leu Leu Ser Leu Lys Glu Ala Ala Lys Ile Ile Gly Thr Lys Gly Ser
      50             55             60
Thr Ile Ser Arg Ile Arg Ala Ala Asn Ala Val Lys Ile Gly Ile Ser
      65             70             75             80
Glu Lys Val Pro Gly Cys Ser Asp Arg Ile Leu Ser Cys Ala Gly Asn
      85             90             95
Val Ile Asn Val Ala Asn Ala Ile Gly Asp Ile Val Asp Val Leu Asn
      100            105            110
Lys Arg Asn Pro Glu Asn Glu Asp Ala Ala Glu Gly Glu Ala Glu Glu
      115            120            125
His Tyr Tyr Phe His Phe Leu Asn His Ile Leu Pro Ala Pro Ser Lys
      130            135            140
Asp Glu Ile Arg Asp Leu Gln Gln Leu Glu Asp Ile Gly Tyr Val Arg
      145            150            155            160
Leu Ile Val Ala Asn Ser His Ile Ser Ser Ile Ile Gly Lys Ala Gly
      165            170            175
Ala Thr Ile Lys Ser Leu Ile Asn Lys His Gly Val Lys Ile Val Ala
      180            185            190
Ser Lys Asp Phe Leu Pro Ala Ser Asp Glu Arg Ile Ile Glu Ile Gln
      195            200            205
Gly Phe Pro Gly Ser Ile Thr Asn Val Leu Ile Glu Ile Ser Glu Ile
      210            215            220
Ile Leu Ser Asp Val Asp Val Arg Phe Ser Thr Glu Arg Ser Tyr Phe
      225            230            235            240
```

Pro His Leu Lys Lys Ser Ser Gly Glu Pro Thr Ser Pro Ser Thr Ser
 245 250 255
 Ser Asn Thr Arg Ile Glu Leu Lys Ile Pro Glu Leu Tyr Val Gly Ala
 260 265 270
 Ile Ile Gly Arg Gly Met Asn Arg Ile Lys Asn Leu Lys Thr Phe Thr
 275 280 285
 Lys Thr Asn Ile Val Val Glu Arg Lys Asp Asp Asp Asp Lys Asp Glu
 290 295 300
 Asn Phe Arg Lys Phe Ile Ile Thr Ser Lys Phe Pro Lys Asn Val Lys
 305 310 315 320
 Leu Ala Glu Ser Met Leu Leu Lys Asn Leu Asn Thr Glu Ile Glu Lys
 325 330 335
 Arg Glu Asn Tyr Lys Arg Lys Leu Glu Ala Ala Glu Gly Asp Ala Thr
 340 345 350
 Val Val Thr Glu Arg Ser Asp Ser Ala Ser Phe Leu Glu Glu Lys Glu
 355 360 365
 Glu Pro Gln Glu Asn His Asp Asn Lys Glu Glu Gln Ser
 370 375 380

<210> 2

<211> 1146

<212> DNA

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 2

atgtcacagt tcttgaagc tgcactccc gttgcaattc ccacaaacaa taccaacggc 60
 ggctccagt atgccggcag cgcgccact ggccggccc ccgttgttg caccaccgct 120
 caaccacca tcaatcacag gcttttgctg tcattgaaag aggtgccaa gatcattgac 180
 actaagggt ccaccatct acgcataaga gctgcaaac ccgtcaagat cggatattct 240
 gaaaaggtgc ccggttgctc tgacaggatc ctgtcctgtg ctgggaacgt aatcaatgtg 300
 gccaatgcca ttggtgatat tggtagctg cttacaaac ggaatccga aatgaggac 360
 gcagctgagg gcgaagcga agagcactac tacttccact tttgaacca tattttacca 420
 gtcctctcaa aggacgagat cagagatctg cagcaactgg aggacatcg ttatgtgagg 480
 ctcatgttg ccaattacca tatctcatcg attatcgga aagcaggcgc caccatcaag 540
 tccctgatca ataagcacgg cgtaagatc gtggttcca aggacttctt acctgctagc 600
 gacgagagaa ttatcgagat ccagggttcc ccaggatcca tcaccaatgt acttatcgaa 660
 attagcgaga tcattctgag tgacgttgac gtcagattca gcacagaaag atcttatttc 720
 cctcatctga aaaagtcctc ccgtgagcca acttcccctt ctacctatc taacactagg 780
 atcgaaattg agattccaga actgtatgta ggccgccatta ttggccgtgg aatgaacaga 840
 attaagaatt tgaaaacttt cacaacaaac aatattgtcg tggaaaggaa ggaatgacgat 900
 gataaagacg aaaatttttag aaatttcata atcacaagta aatttctaa gaatgtcaaa 960
 cttgctgagt ccatgctttt gaagaacctg aatactgaaa ttgagaaacg tgaaaactac 1020
 aagagaaaat tggaagctgc cgaaggagat gccactgttg ttactgaacg ctctgattct 1080
 gcttctttct tggaagagaa ggaagaacct caagagaatc atgataacaa agaggagcag 1140
 tcgtag 1146

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明の実施例にて、出芽酵母の遺伝子欠失株におけるASH1 mRNAの局在を調査した結果を示す表である。

【図2】本実施例において使用された出芽酵母の菌株の種類を示す表である。

【図3】出芽酵母の菌株の種類を示す表であり、図2に示される表の続きである。

【図4】本実施例にて使用されたプラスミドの種類を示す表である。

【図5】ASH1 mRNAおよびmyc標識タンパクの局在を調査した結果を示す写真である。

【図6】左側の模式図が、ASH1 mRNAの局在部位およびU1Atag-Full、U1Atag-N、U1Atag-C、U1Atag-Uを示す模式図であり、右側の表が、各U1A-tag株のGFPと、各myc標識タンパクMyo4myc、She2myc、She3myc、Khd1mycとが共に局在であるか否かを示す表である。なお、表中では、+が共に局在し、-が共に局在しないことを意味する。

【図7】各U1A-tag株のGFPと、各myc標識タンパクとが共に局在するか否かを調査した結果を示す写真である。なお、(a)は、Khd1myc株における結果を示す写真であり、(b)は、She3myc株における結果を示す写真である。

【図8】抗原決定基にtagされたKhd1とShe3は、アンチmyc抗体9E10(myc)またはコントロールIgG(c)を用いて免疫沈澱された結果を示す。各免疫ベレットは10%SDS-PAGEゲルで分離され、プロットされ、エビトープにtagされたタンパク質(Khd1myc、She3myc、U1Ap-GFP)の存在を抗myc抗体あるいは抗GFP抗体でプローブした。なお、totalは、細胞抽出液におけるRNA、IPは、免疫沈澱によって抽出されたRNAを示すゲルの写真である。なお、(a)は、ASH1特異的なプライマーを用いてRT-PCRによって増幅された場合、(b)は、U1Atag-N(N)、U1Atag-U(U)に特異的なプライマーを用いて増幅された場合である。

【図9】KHD1とASH1 mRNAとの間の遺伝的相互作用を調べるために、レポーター遺伝子の発現を調査した結果を示す。なお、SCは、2%グルコースを含む

ように作成された培地であり、SGは、2%ガラクトースを含むように作成された培地である。また+Adeは、アデニン含有を意味し、-Adeはアデニン欠乏を意味する。(a)は、菌株YKEN251、YKEN252、YKEN254、YKEN253が、培地SC-AdeもしくはSC+Adeプレートに線画培養され、30℃で3日間培養した後の菌株の生育を示す。(b)は、菌株YKEN301、YKEN302、YKEN303、YKEN304、YKEN305、YKEN306が、培地SC-AdeもしくはSG-Adeプレートに線画培養され、30℃で3日間培養した後の菌株の生育を示す。

【図10】(a)は、KHD1過剰発現のAsh1mycタンパク質レベルにおける影響を調査するために、ウェスタンブロット分析を行った結果を示す。(b)は、ASH1 mRNAレベルにおけるKHD1の過剰発現の影響を調査するために、ノーザンブロットングを行った結果を示す。(c)は、ASH1 mRNA局在におけるKHD1の過剰発現の影響を調査するために、ASH1アンチセンスプローブによって染色を行った結果を示す。(d)は、ASH1 mRNA局在の異なったパターンを示す細胞のパーセンテージを示す。

【図11】(a)は、Ash1mycタンパク質とASH1 mRNAの発現を調査した結果を示す。(b)は、TTC356(GAL1p-ASH1myc;野生株)とTTC360(GAL1p-ASH1atg-myc)とのASH1 mRNAの局在を比較した結果を示す。(c)は、ASH1 mRNA局在の異なったパターンを示す細胞のパーセンテージを示す。

【図1】

Table 1. ASH1 mRNA localization in disruptants of genes encoding RNA-binding proteins

genotype	% (n=100)			
	anchored	delocalized in the bud	delocalized in mother and bud	neck
wild-type	87	12	1	0
puf1Δ/jan1Δ	85	14	1	0
puf2Δ	69	29	2	0
puf3Δ	85	15	0	0
puf4Δ	83	16	1	0
puf5Δ/mpf5Δ	22	61	16	1
scp150Δ	23	61	16	1
pbp2Δ	76	20	1	0
khd1Δ/yb1032wΔ	53	40	7	0
mer1Δ	78	20	2	0

anchored: tightly localized ASH1 mRNA at the distal tip; delocalized in the bud: delocalized ASH1 mRNA confined to the bud; delocalized in mother and bud: ASH1 mRNA in both mother cell and bud; neck: ASH1 mRNA at the bud neck

【図2】

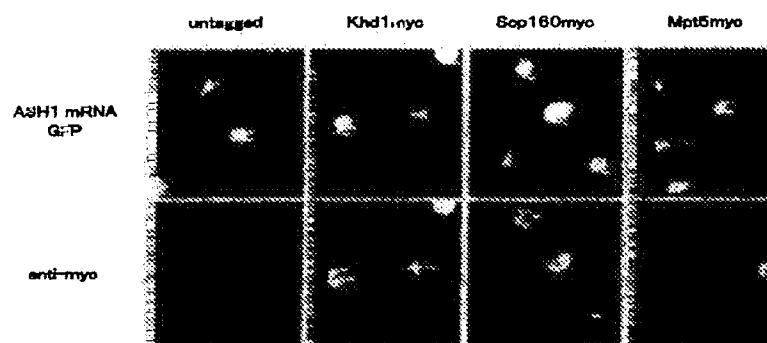
Table 2 Strains used in this study

Strain	Genotype	Source
W303	<i>a ade2 lip1 can1 leu2 his3 ura3 GAL psi+</i>	SH and Herskowitz (1998)
K1107	<i>a HOp-LacZ-HO 3' UTR</i>	Nasmyth (1987)
K5552	<i>α ASH1-myc</i>	Jensen et al. (1996)
10B	<i>α HOp-ADF2-HO 3' UTR</i>	Tadauchi et al. (2001)
TTC356	<i>a GALp-ASH1-myc</i>	This study
TTC360	<i>a GALp-ASH1-myc (Δlg)</i>	This study
YKEN111	<i>α HOp-ADF2-HO 3' UTR puf1Δ/jen1Δ::CgHIS3</i>	This study
YKEN113	<i>α HOp-ADF2-HO 3' UTR puf2Δ::CgHIS3</i>	This study
YKEN112	<i>α HOp-ADF2-HO 3' UTR puf3Δ::CgHIS3</i>	This study
YKEN110	<i>α HOp-ADF2-HO 3' UTR puf4Δ::CgHIS3</i>	This study
YKEN109	<i>α HOp-ADF2-HO 3' UTR puf5Δ/mpt5Δ::CgHIS3</i>	This study
YKEN123	<i>α HOp-ADF2-HO 3' UTR sop180Δ::CgHIS3</i>	This study
YKEN124	<i>α HOp-ADF2-HO 3' UTR pbp2Δ::CgHIS3</i>	This study
YKEN125	<i>α HOp-ADF2-HO 3' UTR khd1Δ::CgHIS3</i>	This study
YKEN126	<i>α HOp-ADF2-HO 3' UTR mer1Δ::CgHIS3</i>	This study
YKEN201	<i>α HOp-ADF2-HO 3' UTR PUF5/MPT5myc::kanMX6</i>	This study

【図3】

YKEN202	<i>α HOp-ADF2-HO 3' UTR SCP180myc::kanMX6</i>	This study
YKEN203	<i>α HOp-ADF2-HO 3' UTR KHD1myc::kanMX6</i>	This study
YKEN204	<i>α HOp-ADF2-HO 3' UTR SHE2myc::kanMX6</i>	This study
#101	<i>α MYO4myc</i>	Jensen (1998)
#134	<i>α SHE3myc</i>	Jensen (1996)
YKEN251	<i>α HOp-ADF2-HO 3' UTR</i>	This study
YKEN252	<i>α HOp-ADF2-HO 3' UTR myo4-910</i>	This study
YKEN253	<i>α HOp-ADF2-HO 3' UTR khd1Δ::CgHIS3</i>	This study
YKEN254	<i>α HOp-ADF2-HO 3' UTR khd1Δ::CgHIS3 myo4-910</i>	This study
YKEN301	<i>α HOp-ADF2-HO 3' UTR kanMX6::GAL1p-KHD1</i>	This study
YKEN302	<i>α HOp-ADF2-HO 3' UTR she3Δ kanMX6::GAL1p-KHD1</i>	This study
YKEN303	<i>α HOp-ADF2-HO 3' UTR myo4Δ kanMX6::GAL1p-KHD1</i>	This study
YKEN304	<i>α HOp-ADF2-HO 3' UTR ash1Δ</i>	This study
YKEN305	<i>α HOp-ADF2-HO 3' UTR she3Δ ash1Δ</i>	This study
YKEN306	<i>α HOp-ADF2-HO 3' UTR myo4Δ ash1Δ</i>	This study
YKEN307	<i>α ASH1-myc kanMX6::GAL1p-KHD1</i>	This study

【図5】

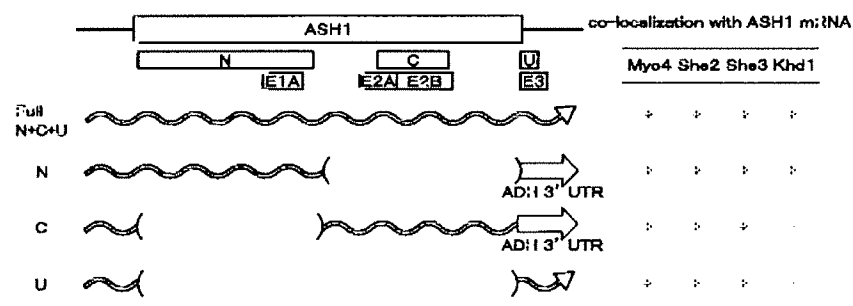


【表4】

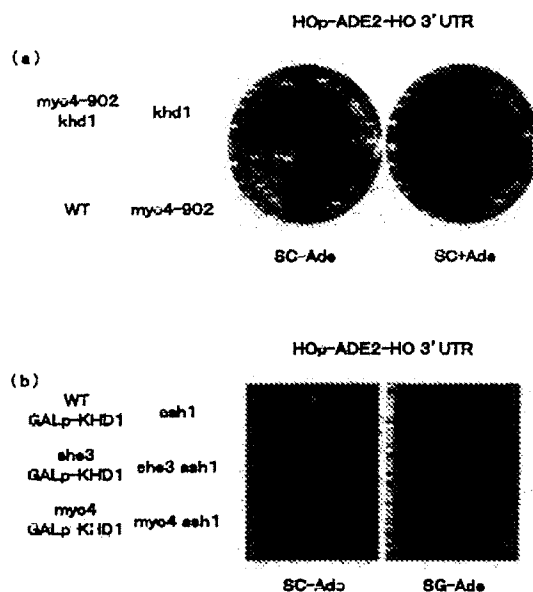
Table 3. Plasmids used in this study

Plasmid	Relevant markers	Source
Yip-lac181	LEU2, 2 μ m	Gietz and Sugino (1988)
YEplac195	URA3, 2 μ m	Gietz and Sugino (1988)
pRS426	URA3, 2 μ m	Sikorski and Hieter (1989)
pAS181	LEU2, 2 μ m, <i>ASH1</i>	Sil and Herskowitz (1996)
pPT120 (U1Atag-Full)	<i>HIS3</i> , 2 μ m, GAL1p-U1Atag- <i>ASH1</i> (1-1764)- <i>ASH1</i> 3' UTR	Takizawa and Vale (2000)
pPT220	<i>TRP1</i> , <i>CFN-ARS</i> , <i>TDH3p-U1A-GFP-GSI-NLS</i>	Takizawa and Vale (2000)
pK114 (U1Atag-Full)	URA3, 2 μ m, GAL1p-U1Atag- <i>ASH1</i> (1-1764)- <i>ASH1</i> 3' UTR	This study
pK422 (U1Atag-U)	URA3, 2 μ m, GAL1p-U1Atag- <i>ASH1</i> 3' UTR	This study
pK622 (U1Atag-N)	URA3, 2 μ m, GAL1p-U1Atag- <i>ASH1</i> (1-804)- <i>ADH1</i> 3' UTR	This study
pK852 (U1Atag-C)	URA3, 2 μ m, GAL1p-U1Atag- <i>ASH1</i> (828-1764)- <i>ADH1</i> 3' UTR	This study
pK738	URA3, 2 μ m, GAL1p- <i>KHD1</i>	This study
pFA6a-13Myc-kanMX6	13MYC- <i>ADH1</i> 3' UTR-kanMX6	Longtine et al. (1998)
pFA6a-kanMX6-GAL1p-3HA	kanMX6-GAL1p-3HA	Longtine et al. (1998)
pCytHIS3	<i>Candida glabrata HIS3</i> in pUC19	Sakuramoto et al. (1999)

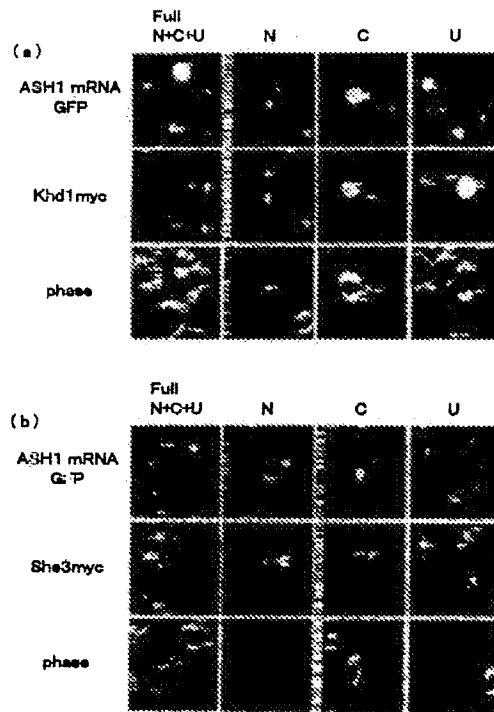
【表6】



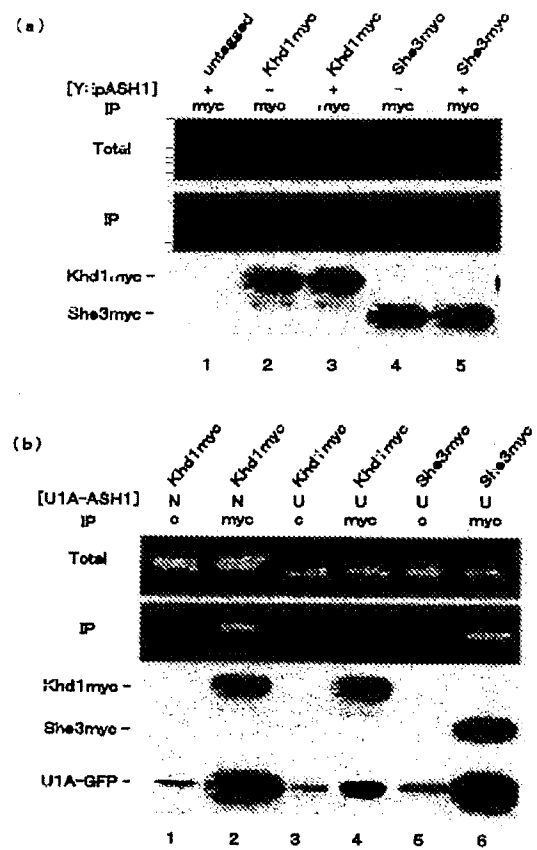
【表9】



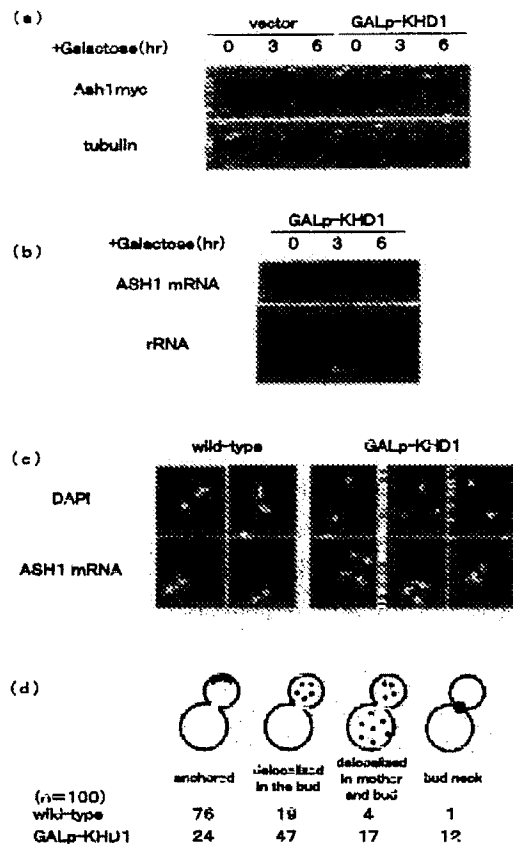
【図7】



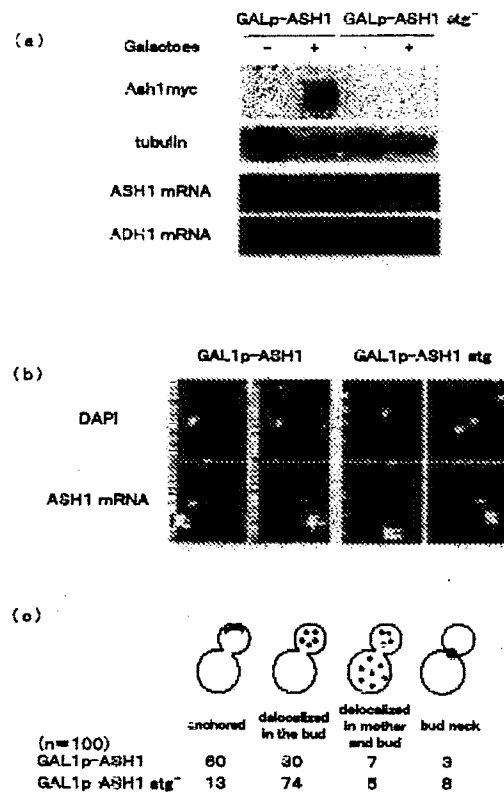
【図8】



【図10】



【図11】



フロントページの続き

(72)発明者 ベーター エー. タキザワ
アメリカ合衆国, コネチカット州 06520
-8002, ニュー ヘブーン, セダール スト
リート 333, エール ユニバーシティ
スクール オブ メディシン, デパートメ
ント オブ セル バイオロジー 内

(72)発明者 ロナルド ディー. ヴェイル
アメリカ合衆国, カリフォルニア州
94143-0448, サン フランシスコ, ユニ
バーシティ オブ カリフォルニア, デパ
ートメント オブ セルラー アンド モ
レキュラー ファーマコロジー 内

(72)発明者 松本 邦弘
愛知県名古屋市昭和区田面町2-44 ロー
レルコート昭和区田面町201号

(72)発明者 イーラ ヘルスコヴィッツ
アメリカ合衆国, カリフォルニア州
94143-0448, サン フランシスコ, ユニ
バーシティ オブ カリフォルニア, デパ
ートメント オブ バイオケミストリー
アンド バイオフィジクス 内

Fターム(参考) 4B024 AA20 BA63 CA04 DA12 EA04
FA02 GA11
4B065 AA80X AA80Y AB01 AC20
BA02 CA24
4H045 AA10 BA10 CA15 EA50 FA74